

Deteksi *Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)* – Metode *quantitative (Real-Time)* – Polymerase Chain Reaction (qPCR) menggunakan *hydrolysis probe*



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip umum	2
4 Peralatan	2
5 Bahan	3
6 Prosedur	3
7 Interpretasi hasil	6
8 Jaminan mutu pengujian.....	7
Bibliografi	8



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Deteksi *Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)* – Metode *quantitative (Real-Time) – Polymerase Chain Reaction (qPCR)* menggunakan *hydrolysis probe*.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya, dan telah dibahas melalui rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 21 November 2012 di Bogor, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, pembudidaya, perguruan tinggi, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.03/Men/2010 tentang Daftar Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK).
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 11 Maret 2013 sampai 10 Mei 2013 dengan hasil akhir RASNI.

**Deteksi *Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)* –
Metode *quantitative (Real-Time) – Polymerase Chain Reaction (qPCR)*
menggunakan *hydrolysis probe***

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)* dengan metode *Quantitative (Real-Time) – Polymerase Chain Reaction (qPCR)* menggunakan *Hydrolysis Probe*.

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut ini digunakan.

2.1

amplifikasi

proses penggandaan asam deoksiribonukleat (DNA) secara *in vitro*

2.2

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

2.3

Cq (quantification cycle)/ Ct (cycle threshold)/ Cp (crossing point)

titik perpotongan antara kurva amplifikasi kontrol negatif dengan sampel atau titik awal terjadinya kenaikan kurva amplifikasi

2.4

denaturasi

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

2.5

deoxyribo nucleic acid (DNA)

materi genetik yang tersusun atas nukleotida dengan gula deoksiribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen (guanin, adenin, sitosin, timin)

2.6

ekstensi

proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim DNA *polymerase*, sehingga akan terbentuk 2 buah DNA untai tunggal

2.7

hydrolysis probe

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang dilabel dengan sebuah *fluorophore* secara kovalen pada ujung 5' dan sebuah *quencher* pada ujung 3' yang akan berpendar ketika terjadi proses amplifikasi

2.8

kuantifikasi

pernyataan jumlah satuan dalam angka

2.9

kontrol negatif amplifikasi

nuclease-free water yang diperlakukan sama dengan hasil ekstraksi contoh uji

2.10

kontrol negatif ekstraksi

hasil ekstraksi yang berasal dari *nuclease-free water*

2.11

kontrol positif amplifikasi

hasil transkripsi *in vitro* plasmid rekombinan yang mengandung fragmen gen virus

2.12

kontrol positif ekstraksi

hasil ekstraksi yang berasal dari organ atau contoh uji yang terinfeksi

2.13

Limit of Detection (LOD)

jumlah *copy* atau molekul target terendah yang masih dapat dideteksi dengan tingkat kepercayaan 95%

2.14

primer

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

2.15

real-time PCR

suatu teknik PCR dengan metode analisa yang secara simultan dapat diamati hasil amplifikasinya

2.16

standar positif

plasmid yang mengandung DNA virus yang diketahui jumlah *copy*nya

2.17

template

sekuen DNA tertentu yang akan diamplifikasi

3 Prinsip umum

Prinsip dari metode ini adalah mengisolasi dan memurnikan DNA dari organ target/ jaringan yang diduga terinfeksi IHHNV untuk diamplifikasi secara *real-time*.

4 Peralatan

- a) alat pengukur konsentrasi asam nukleat berbasis UV *Spectrophotometry*;
- b) *centrifuge*;
- c) *freezer* (-20 °C);
- d) *heating block*;
- e) *laminar air flow*;
- f) *minimixer*;
- g) mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1 000 µl;

- h) pinset dan gunting;
- i) 1 paket mesin *real-time* PCR;
- j) *rack ice block*;
- k) *spindown centrifuge*;

5 Bahan

- a) *ethanol* p.a;
- b) *filtered microtip* berbagai ukuran 10 µl – 1 000 µl;
- c) kit ekstraksi DNA dengan metode *spin column*;
- d) kit *real-time* PCR komersial *compatible* dengan *TaqMan*[®] *probe*;
- e) kontrol positif IHHNV;
- f) larutan ekstraksi DNA komersial;
- g) masker;
- h) *microtube* ukuran 1,5 ml – 2 ml;
- i) *nuclease-free water*;
- j) *pellet pestle*/penggerus jaringan;
- k) sarung tangan (*powder-free*);
- l) tabung atau *microplate* PCR optikal ukuran 0,1 ml - 0,2 ml atau tabung kapiler ukuran 20 µl - 100 µl;
- m) tris EDTA (TE) *buffer* (konsentrasi 10 mM Tris HCl 1 mM EDTA pH 7.5);
- n) 1 set primer spesifik dan probe:
 - IHHNV1608F : 5'-TAC TCC GGA CAC CCA ACC A-3'
 - IHHNV1688R : 5'-GGC TCT GGC AGC AAA GGT AA-3'
 - IHHNV *probe* : 5'-FAM-ACC AGA CAT AGA GCT ACA ATC CTC GCC TAT TTG-TAMRA-3'

CATATAN 1 bahan disesuaikan dengan metode standar yang digunakan

CATATAN 2 bisa menggunakan *primer* dan *TaqMan*[®] *probe* lainnya yang sudah tervalidasi dan sudah diverifikasi di laboratorium

6 Prosedur

6.1 Persiapan Contoh Uji

- a. Telur, larva dan *pasca larva*
Contoh dapat diambil dari seluruh tubuh udang.
- b. Juvenil sampai dewasa
Contoh dapat diambil dari bagian *pleopod*, *haemolymph*, otot ekor, jaringan ikat, organ limfoid, atau insang baik segar maupun beku (-20 °C) atau yang sudah diawetkan dalam larutan *ethanol* minimal 75%.

6.2 Ekstraksi DNA

6.2.1 Metode presipitasi

- a) masukkan 25 mg – 50 mg contoh uji ke dalam *microtube* 1,5 ml.
- b) tambahkan 1 000 µl larutan ekstraksi DNA komersial, homogenkan menggunakan *pellet pestle*.
- c) sentrifugasi pada 10 000 x g selama 10 menit.
- d) pindahkan supernatan ke *microtube* baru yang telah diisi 500 µl *ethanol* 96%.
- e) kocok *microtube* secara perlahan, diamkan selama 1 menit.
- f) sentrifugasi pada 4 000 x g selama 1 menit.

- g) buang cairan, cuci *pellet* dengan 1 000 μ l *ethanol* 75%, diamkan selama 1 menit.
- h) buang cairan, keringkan selama 15 detik.
- i) cuci kembali *pellet* dengan 1 000 μ l *ethanol* 75%, diamkan selama 1 menit.
- j) buang cairan, keringkan selama 15 detik.
- k) tambahkan 8 mM NaOH sebanyak 200 μ l dan homogenkan.
- l) ukur konsentrasi DNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm. Hitung konsentrasi DNA dengan menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

A_{260} = Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

- m) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan.
- n) periksa kemurnian DNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280}).
- o) simpan larutan DNA pada -20°C.

6.2.2 Metode *spin column*

- a) sebelum proses dimulai, panaskan *elution buffer* pada 70 °C.
- b) masukkan 25 mg – 50 mg contoh uji ke dalam *microtube* 1,5 ml.
- c) tambahkan 200 μ l *tissue lysis buffer* dan 40 μ l *proteinase K* dan homogenkan.
- d) inkubasi pada 55 °C selama 1 jam.
- e) tambahkan 200 μ l *binding buffer* dan homogenkan.
- f) inkubasi pada 70 °C selama 10 menit.
- g) tambahkan 100 μ l isopropanol dan homogenkan.
- h) buang bagian sampel yang tidak terlarut dengan mikropipet.
- i) pindahkan seluruh larutan tersebut ke dalam *filter tube* dengan *collection tube* yang telah dikombinasikan.
- j) sentrifugasi pada 8 000 x g selama 1 menit.
- k) pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi. Pasangkan kembali *filter tube* dengan *collection tube*.
- l) tambahkan 500 μ l *inhibitor removal buffer* ke dalam *filter tube*.
- m) sentrifugasi pada 8 000 x g selama 1 menit.
- n) pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi. Pasangkan kembali *filter tube* dengan *collection tube*.
- o) tambahkan 500 μ l *wash buffer* ke dalam *filter tube*.
- p) ulangi langkah no. m) sampai dengan no. n).
- q) sentrifugasi kembali pada 13 000 x g selama 10 detik.
- r) buang *collection tube*.
- s) pasang *filter tube* dengan *microtube* 1,5 ml steril (*nuclease-free*).
- t) tambahkan 200 μ l *elution buffer* yang telah dipanaskan ke dalam *filter tube*.
- u) sentrifugasi pada 8 000 x g selama 1 menit. Hasil sentrifugasi yang terdapat pada *microtube* merupakan RNA murni.
- v) ukur konsentrasi DNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm. Hitung konsentrasi DNA dengan menggunakan rumus :

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

A_{260} = Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

- w) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan.

- x) periksa kemurnian DNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280}).
- y) simpan larutan DNA pada -20 °C.

CATATAN 1 prosedur metode presipitasi dan *spin column* di atas merupakan contoh ekstraksi DNA yang menggunakan kit komersial

CATATAN 2 prosedur ekstraksi DNA disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan

6.3 Amplifikasi

- a) cairkan *template* DNA, *primer*, *probe*, *PCR master mix*, *nuclease-free water*, dan letakkan di atas es.
- b) buat *cocktail* sesuai dengan Tabel 1. Siapkan volume *cocktail* 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan.
- c) homogenkan semua bahan *cocktail* dan distribusikan 19 µl ke masing-masing tabung/*microplate*/ kapiler PCR optikal.
- d) tambahkan 1 µl *template* DNA (25 ng – 75 ng) contoh uji, kontrol positif ekstraksi, kontrol negatif ekstraksi; kontrol negatif amplifikasi (NTC); dan 4 standar positif (10 *copies*; 10² *copies*; 10³ *copies*; 10⁴ *copies*).
- e) lakukan amplifikasi dengan *real-time* PCR sesuai Tabel 2.

CATATAN seluruh proses preparasi reagen dilakukan diatas es

Tabel 1 – Komposisi cocktail *real-time* PCR

No	Nama Bahan	Volume (µl)	Konsentrasi Akhir
1	<i>nuclease-free water</i>	12,5	-
2	5x <i>master mix</i>	4	1 x
3	IHHNV1608F (10 µM)	1	0,5 µM
4	IHHNV1688R (10 µM)	1	0,5 µM
5	IHHNV <i>probe</i> (10 µM)	0,5	0,25 µM
Total		19	

CATATAN komposisi cocktail disesuaikan dengan *manual kit* yang digunakan

Tabel 2 – Profil amplifikasi

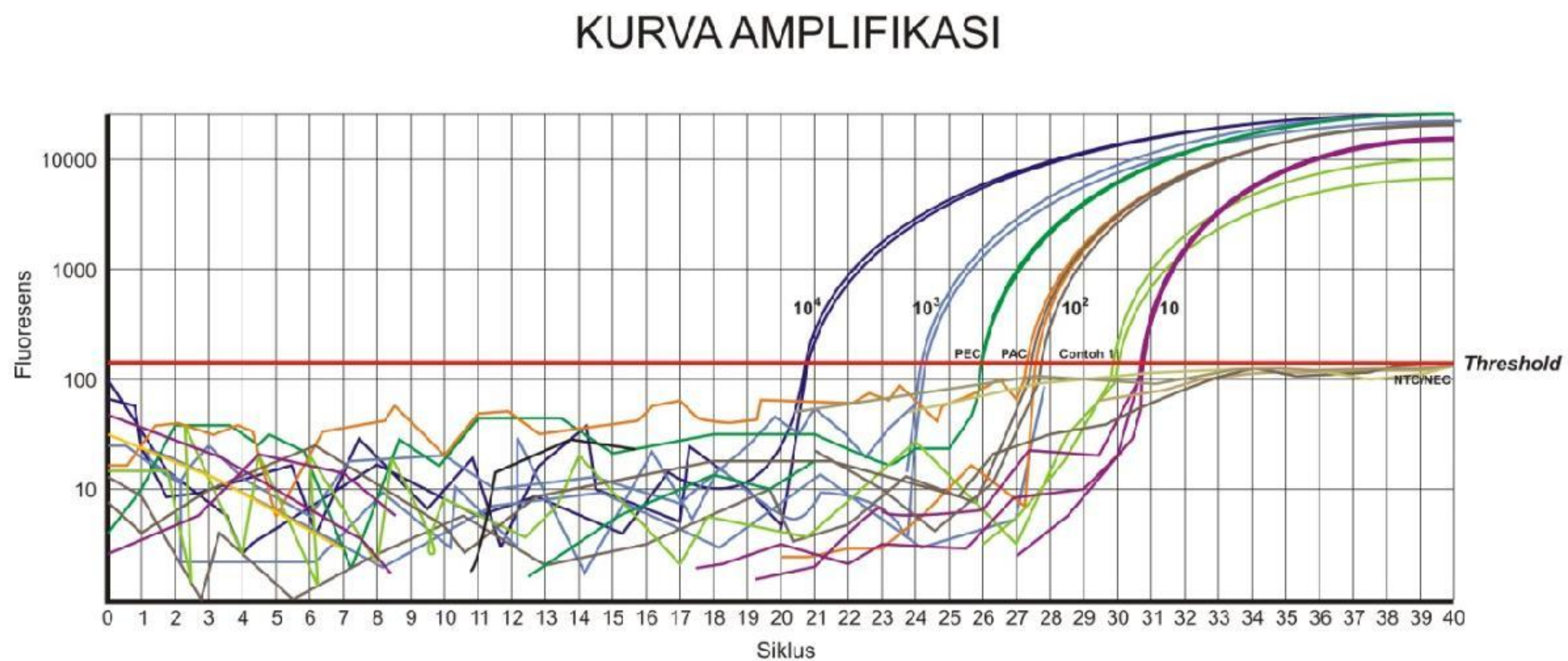
Proses		Suhu (°C)	Waktu	Siklus	Mode analisis	Mode akuisisi
<i>Hot Start</i>		50	2 menit	1	-	-
Denaturasi awal		95	10 menit	1	-	-
Amplifikasi	Denaturasi	95	15 detik	40	Kuantifikasi	-
	<i>Annealing</i> dan Ekstensi	60	1 menit			<i>Single</i>
<i>Cooling</i>		40	30 detik	1	-	-

CATATAN profil amplifikasi disesuaikan dengan *manual kit* dan mesin *real-time* PCR yang digunakan

7 Interpretasi hasil

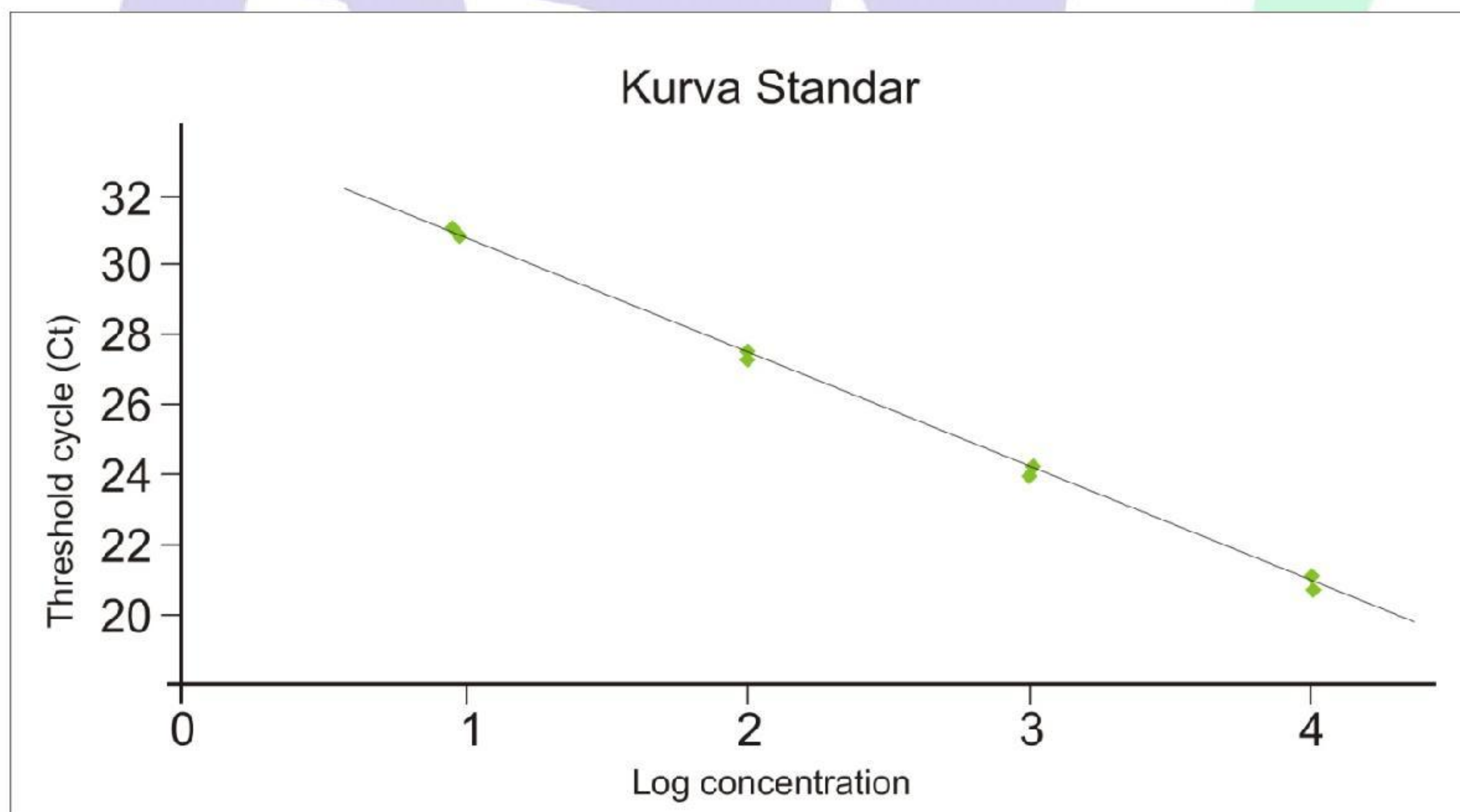
Lakukan analisis data sesuai dengan *software real-time cyclers* yang digunakan.

a) Pengamatan selama proses *real-time* PCR :



Gambar 1 – Contoh kurva amplifikasi

Berdasarkan gambar 1, semakin awal naiknya kurva menunjukkan jumlah *copy* DNA virus yang semakin tinggi dan sebaliknya, apabila tidak terjadi kenaikan kurva menunjukkan tidak ada amplifikasi.



Gambar 2 – Contoh kurva standar

Interpretasi kurva amplifikasi *real-time* PCR adalah sebagai berikut:

- *Threshold/ cut off* ditentukan dengan menarik garis datar yang berada diatas perpotongan antara *No Template Control* (NTC) dan kontrol negatif ekstraksi dengan kontrol positif ekstraksi dan kontrol positif amplifikasi.
- Contoh uji dinyatakan positif apabila terlihat naiknya kurva di atas garis *threshold/ cut off* dan nilai *Cq* lebih kecil atau sama dengan LOD.

- Contoh uji dinyatakan negatif apabila berada dibawah garis *threshold/ cut off* dan nilai Cq lebih besar dari LOD dengan tingkat kepercayaan (*confident level*) 95%.

b) Kuantifikasi *copy* virus

Jumlah *copy* virus dapat dilihat pada tabel laporan kuantifikasi di perangkat lunak komputer yang terhubung dengan mesin *real-time* PCR yang digunakan. Nilai positif akan terlihat dari nilai konsentrasi pada angka tertentu.

Tabel 3 - Contoh laporan hasil kuantifikasi *copy* virus

No.	Nama	Tipe	Cq	Konsentrasi	Standar
1	Kontrol negatif ekstraksi	Unknown	-	-	-
2	Kontrol negatif ekstraksi	Unknown	-	-	-
3	Kontrol negatif amplifikasi	Unknown	-	-	-
4	Kontrol negatif amplifikasi	Unknown	-	-	-
5	Kontrol positif ekstraksi	Unknown	25,95	2,19E+03	-
6	Kontrol positif ekstraksi	Unknown	26,11	1,90E+03	-
7	Kontrol positif amplifikasi	Unknown	27,36	1,84E+02	-
8	Kontrol positif amplifikasi	Unknown	27,50	1,37E+02	-
9	Standar 10 ¹	Standard	30,76	9,86E+00	1,37E+01
10	Standar 10 ¹	Standard	30,86	8,10E+00	1,37E+01
11	Standar 10 ²	Standard	27,56	3,79E+02	1,37E+02
12	Standar 10 ²	Standard	27,91	2,31E+02	1,37E+02
13	Standar 10 ³	Standard	24,07	8,27E+03	1,37E+03
14	Standar 10 ³	Standard	24,15	7,21E+03	1,37E+03
15	Standar 10 ⁴	Standard	20,77	1,61E+04	1,37E+04
16	Standar 10 ⁴	Standard	20,75	1,65E+04	1,37E+04
17	Contoh uji 1	Unknown	29,86	8,63E+01	-
18	Contoh uji 1	Unknown	30,12	7,98E+01	-
19	Contoh uji 2	Unknown	> 40,00	-	-
20	Contoh uji 2	Unknown	> 40,00	-	-

8 Jaminan mutu pengujian

- proses ekstraksi DNA dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif ekstraksi (PEC) dan kontrol negatif ekstraksi (NEC) atau dengan menggunakan *reference gene* dan menunjukkan hasil yang konsisten.
- hasil ekstraksi DNA mempunyai rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,8 – 2,1.
- proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif amplifikasi (PAC) dan kontrol negatif amplifikasi (NAC) serta menunjukkan hasil yang konsisten.
- efisiensi amplifikasi dinyatakan baik apabila mempunyai nilai *slope* -3,10 sampai dengan -3,58.
- proses *real-time* PCR valid bila dilihat dari kurva standar dengan nilai Koefisien Determinasi (R^2) > 0,985.
- keterulangan (*repeatability*) untuk pengujian *duplo* harus mempunyai nilai Standar Deviasi (SD) Cq lebih kecil dari 0,5.
- apabila hasil Cq dari contoh uji mendekati nilai LOD, maka harus dilakukan pengujian amplifikasi kembali sebanyak tiga kali ulangan terhadap contoh uji yang sama. Hasil uji yang dominan akan dipakai untuk menentukan hasil positif atau negatif.

Bibliografi

Invitrogen. 2011. *Manual Protocol DNAzol[®] Reagent Extraction Kit*.

OIE. 2009. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Chapter 2.2.2.

Roche. 2004. *LightCycler[®] TaqMan Master Instruction Manual*.

Roche. 2010. *Manual Procedure of High Pure PCR Template Preparation Kit*.

